زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دورهٔ ۳، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۱

غنی‌سازی نان‌های حجیم با باسیلوس‌های بالقوه پروبیوتیک (*باسیلوس کواگولانس*)

مهشید گنجوری[۱*]، صدیقه مهرابیان[۲]، عباس اخوان سپهی[۳]

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی،دانشکده علوم پایه،دانشگاه آزاد اسلامی واحد شمال تهران
۲- استاد گروه میکروبیولوژی،دانشکده علوم پایه،دانشگاه آزاد اسلامی واحد شمال تهران
۳- دانشیار میکرو بیولوژی، دانشکده علوم پایه،دانشگاه آزاد اسلامی واحد شمال تهران

*** تهران، صندوق پستی ۱۹۳۳۶۷۳۱۶۵**
honiras24@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۹۰/۵/۲٤، پذیرش: ۹۰/۱۲/۱۷)

چکیده- پروبیوتیک‌ها میکروب‌های زنده‌ای هستند که حضورشان در مواد غذایی، با بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش آثار مفیدی برای میزبان خود دارد. تحقیقات به تازگی نشان داده که باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک، به خصوص باسیلوس‌ها (به‌خاطر داشتن اندوسپور) در دمای پخت پایدار باقی مانده و فواید پروبیوتیکی خود را در غذاهای پختنی حفظ می‌کنند هدف این پژوهش، استفاده از *باسیلوس کواگولانس* به عنوان یک پروبیوتیک مقاوم، برای غنی‌سازی نان‌های حجیم است. دراین پژوهش ابتدا با انجام آزمایش‌های تحمل نمک، مقاومت گرمایی، تحمل صفرا، تحمل اسید و پپسین، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، ممانعت از رشد سویه‌های بیماریزا، پروبیوتیک بودن این باکتری مشخص شد. سپس تعداد معینی از سلول‌های *باسیلوس کواگولانس* در خمیر نان وارد شد، قبل و بعد از پخت نیز با روش شمارش باکتری‌های زنده، تعداد باکتری‌ها در ۱ گرم از خمیر و نان محاسبه شد یافته‌ها: باسیلوس کواگولانس از $۱۰^{۸}$عدد در هر گرم، بعد از پخت نان به $۱۰^{٦}$ عدد کاهش یافت. میزان نشاسته هم پس از پخت کاهش یافته و به قندهای ساده تبدیل شده pH نان حدود ٤/٥ تا ٥ بوده و اسیدیته کل نیز بین ۸ و ٦ ارزیابی گردید، سرانجام نمونه غنی‌سازی‌شده به‌وسیله‌ی کارشناسان غلات ارزیابی حسی و از نظر کیفی، چشایی و لمسی، با نمونه شاهد مقایسه شد.

کلید واژگان: پروبیوتیک، باسیلوس کواگولانس، نان.

۱- مقدمه

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)، پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که اگر به میزان کافی به ماده غذایی اضافه شوند برای سلامتی میزبان (انسان) مفید خواهند بود [۱و ۲و ۳].

پروبیوتیک‌ها میکروب‌های زنده‌ای هستند که حضورشان در مواد غذایی با بهبود (اصلاح) تعادل

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

میکروبی دستگاه گوارش آثار مفیدی بر میزبان دارد؛ فوایدی مانند بهبود تغذیه و رشد و جلوگیری از ناراحتی‌های گوارشی، محصولات حاوی پروبیوتیک همان‌گونه که در مواد غذایی حیوانی و یا کشاورزی استفاده می‌شود برای مصرف انسان هم وجود دارند. [٤ و٥]

پروبیوتیک‌ها میکروفلور دستگاه گوارش را متعادل کرده و عملکرد سلول‌های اپیتلیال و فعالیت ایمنی لایه مخاطی را حفظ می‌کنند [٦]. وبه‌طور مستقیم باعث افزایش IgA می‌شوند [٧]. بخش زیادی از پروبیوتیک‌ها متعلق به گونه‌های باکتری‌های لاکتیک (*لاکتو باسیلوس‌ها*) هستند و از این رو به آن‌ها لاکتی‌بیوتیک نیز می‌گویند [٨]. به طور سنتی، محصولات لبنی سرد، روش برتر برای تولید و کشت پروبیوتیک‌ها است [٩] اما به‌تازگی تحقیقات نشان داده که باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک به‌خصوص باسیلوس‌ها، در غذاهای پختنی پایدار باقی مانده و فواید پروبیوتیکی خود را در دمای پخت حفظ می‌کنند [١٠]. این باکتری‌ها به‌خاطر تولید اسپور می‌توانند در فرایند پخت مواد زنده بمانند [١١]؛ مواد پختنی مانند نان، کیک، پای، تارت، غلات، پیتزا، چیپس و سبزیجات آبگیری‌شده و... هر نوع ترکیب دارای آرد و یا هر ترکیبی که حرارت می‌بیند می‌شود [١٠].

از جمله باسیلوس‌هایی که می‌توان از آن به علت خواص ذاتی در فرایند پخت استفاده کرد *باسیلوس کواگولانس (لاکتوباسیلوس اسپوروژنز)* است.

گونه *لاکتوباسیلوس اسپوروژنز* در ۱۹۳۲ توسط *L. M. Horowitz-Wlassowa* و *N. W. Nowotelnow* جدا و شرح داده شد و متعاقب آن به عنوان *باسیلوس اسپوروژنز* طبقه‌بندی شد؛ اما به علت اسپوردار بودن هیچگاه به عنوان *لاکتوباسیلوس* پذیرفته نشد [١٢]. به تازگی شواهد گویای این است که این باکتری همان صفات *باسیلوس کواگولانس* را دارد و در نتیجه به آن گروه منتقل شد [٣].

صفات کلی *باسیلوس کواگولانس* از این قرار است: باسیل گرم مثبت، اسپوردار، متحرک، طنابی شکل، تک‌تک یا به‌صورت زنجیره‌های کوتاه، دمای بهینه برای رشد ۳۵–۵۰ درجه سانتی‌گراد و pH بهینه ٥/٥–٦/٥ است. از نظر متابولیکی، بی‌هوازی اختیاری است و ازتخمیر مالتوز، مانیتول، رافینوز، سوکروز و تره‌هالوز اسید بدون گاز ایجاد می‌کند [٢٠]

باسیلوس کواگولانس یک پروبیوتیک تولیدکننده اسپور است واسپور در مقابل حرارت و فشار در فرایند تولید، از سلول محافظت کرده و پایداری آن را هنگام گذشتن از دستگاه گوارش در برخورد با اسید معده و صفرا حفظ می‌کند، این اسپور با رسیدن به روده کوچک شروع به تندش کرده و یک باکتری جدید تولید می‌کند. مقاومت و پایداری بالای اسپور این باکتری در مقابل حرارت، فشار و اسید باعث می‌شود آن را به‌عنوان یک انتخاب مناسب برای استفاده در محصولات غیرلبنی در مقایسه با دیگرگونه‌ها برگزینیم.

حضور این باکتری در دستگاه گوارش مبتلایان به سندروم روده تحریک پذیر (IBS) بررسی و مشخص شده که *باسیلوس کواگولانس* بر کاهش روزانه حرکات روده مؤثر است و علایم این بیماری مانند یبوست، اسهال، و یا علایم مربوط به گازهای روده‌ای بعد از غذا را کاهش می‌دهد [١٠].

این باکتری همچنین می‌تواند با اثر روی سیستم ایمنی در درمان برخی عفونت‌های ویروسی مثل ویروس آنفولانزا و آدنوویروس مؤثر باشد. بر اساس تحقیقات انجام‌شده در تعدادی از افرادی‌که به‌طور روزانه *باسیلوس*

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

کواگولانس مصرف می‌کردند و در معرض این ویروس‌ها قرار گرفتند؛ مشاهده شد به‌گونه‌ای چشم‌گیر تولید T cell از TNFα افزایش یافته است؛ در میان این افراد هیچ عوارض جانبی جدی نیز مشاهده نشد[٦].

خواص ضدالتهابی آن در Invitro با تولید IL10 به اثبات رسیده و برای درمان التهاب روده و یا حتی آرتریت روماتوئید مورد توجه قرار گرفته است. [١٤و١٥]. *باسیلوس کواگولانس* به‌طور چشم‌گیری در کاهش کلسترول تام خون، نسبت کلسترول تام به LDLو نسبت کلسترول تام به HDL و به میزان کمی در افزایش HDLخون مشارکت داشت[٣].

بنابراین با توجه به تأثیرات مثبت و فواید متعدد این باکتری، از آن به عنوان یک پروبیوتیک قابل استفاده در مواد غذایی پختنی، به‌خصوص غلات می‌توان بهره برد. نیاز روز افزون کشور به گسترش صنعت نان و مصرف رو به گسترش پروبیوتیک‌ها در مواد غذایی به‌عنوان یک افزودنی مفید و مجاز، سبب انجام این پژوهش شد تا شرایط استفاده بهینه از این باکتری در نان‌های صنعتی بررسی شود.

٢- مواد و روش‌ها

کشت باکتری

سویه مورد نظر در MRS. Agar کشت داده و به‌مدت ٢٤-٤٨ ساعت در ٣٧ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده برای اثبات درستی و خلوص کلنی‌ها، بررسی مورفولوژیک و آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شد.

انجام آزمون‌های میکروبی و بیوشیمیایی

برای اثبات درستی و خلوص کلنی‌ها، بررسی مورفولوژیک، رنگ‌آمیزی گرم و مالاشیت گرین و نیز آزمون‌های بیوشیمیایی مانند: آزمون‌های کاتالاز، ایندول، هیدرولیزژلاتین، حرکت و توانایی تخمیر قندهای گلوکوز، لاکتوز، گالاکتوز، فروکتوز و مانوز انجام شد

اثبات پروبیوتیک بودن باکتری‌ها

برای بررسی باکتری‌های پروبیوتیک، بیشترین کاری که در شرایط آزمایشگاهی انجام شده، ایجاد شرایط داخلی دستگاه گوارش است، pHهای مختلف و غلظت‌های متفاوتی از نمک‌های صفراوی در زمان‌های متغیر برای تعیین بقای گونه‌های تحت آزمون، استفاده می‌شود [١٦].

تست تحمل نمک

آزمایش در رقت‌های ٠/٥، ٢/٥، ٥، ١٠و٢٠ درصد از NaCl با تعداد اولیه ١/٥×١٠^٨ (٠/٥ مک‌فارلند) انجام شد و لوله‌ها به مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور ٣٧درجه سانتی‌گراد قرارداده شدند. کدورت لوله‌ها که در اثر رشد باکتری در محیط ایجاد شده، به‌صورت +٢، +١ و - (منفی) گزارش شد و نیز پورپلیت در محیط‌های MRS. Agar و Mullerhinton. Agar انجام شد[١٢].

تست مقاومت گرمایی

با توجه به این‌که اسپور *باسیلوس کواگولانس* دمای ١٠٠ درجه سانتی‌گراد را ٢٠ دقیقه و یا حتی بیشتر می‌تواند تحمل کند، نمونه اولیه با غلظت ١/٥×١٠^٨ (٠/٥ مک‌فارلند) از هر نمونه در سرم فیزیولوژی تهیه شده و به‌مدت ٢٠ دقیقه در بن‌ماری ١٠٠ درجه (نقطه جوش) قرار داده شد؛ سپس از هر یک از لوله‌ها به‌صورت سریالی پورپلیت در محیط‌های MRS. Agar و Mullerhinton. Agar تهیه شد و به مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور ٣٧ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در دمای ١٠١ درجه

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

سانتی‌گراد، اسپورهای حساس به حرارت *باسیلوس کواگلانس* می‌توانند به فرم مقاوم تبدیل شوند[۲۱].

تست تحمل صفرا

۱/۵×۱۰^۸(۰/۵ مک‌فارلند) در هر میلی‌لیتر از بافر ایزوتونیک (سرم فیزیلوژی) سوسپانسیون شده، برای بررسی تحمل نمک‌های صفراوی در ۱۰۰cc، نوترینت براث به‌میزان ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد نمک صفراوی اضافه کرده و در فاصله‌های زمانی ۱ تا ۳ ساعت جذب نوری نمونه‌هارا در طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۲].

مقاومت به اسید و پپسن

برای تعیین مقاومت به اسید و پپسین ابتدا ۱/۵×۱۰^۸(۰/۵ مک فارلند) در هر میلی‌لیتر از بافر ایزوتونیک حاوی ۲ /۰ درصد پپسین با pH۲ و نیز pH۷ (به‌عنوان کنترل) سوسپانسیون شد و در انکوباتور قرار گرفت؛ سپس در زمان‌های، ۰، ۱، ۲ و ۳ ساعت سنجش پایداری آن‌ها با روش پورپلیت و نیز تعیین جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر بررسی شد. [۱۲].

مقاومت به آنتی‌بیوتیک

در این قسمت مقاومت آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، جنتامایسن، نالیدیک‌سیک‌اسید، تتراسایکلین، لینکومایسین و نئومایسن مطابق استانداردهای گزارش‌شده در سایت CLSI بررسی شد. [۱۲-۲۲].

پیش‌گیری از رشد سویه‌های بیماریزا

یک سویه پروبیوتیک خوب در صورت پیش‌گیری از رشد سویه‌های بیماریزا می‌تواند در بالا بردن سطح سلامت میزبان مفید باشد. در این آزمایش از سویه‌های *staphylococcus aureus* (ATCC :25923)، *Ecoli* (ATCC: 25922) و *Enterococcus fecalis* (ATCC: 29212) استفاده شد. سویه‌های اندیکاتور به مدت ۲۴ ساعت در محیط BHI Agar (۰/۷ درصد آگار) در شرایط هوازی و دمای ۳۷°C گرم‌خانه‌گذاری شدند. سویه‌های لاکتوباسیل بررسی شده (*باسیلوس کواگولانس*) به‌صورت نقطه‌ای در محیط MRS Agar کشت داده شدند. محدوده کشت به‌صورت دایره‌ای به قطر ۱ cm تعیین شد، و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرم‌خانه‌گذاری شدند. حدود ۵×۱۰^۷ سلول از سویه‌های اندیکاتور و یا ۵ میلی‌لیتر از محیط‌های کشت BHI Broth حاوی اندیکاتور در سطح پلیت پخش شد و در شرایط هوازی در دمای ۳۷°C گرم‌خانه‌گذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت از روی قطر هاله عدم رشد (بر اساس میلی‌متر) باکتری‌های اندیکاتور، توان ضدمیکروبی آن‌ها بررسی شد [۱۲-۲۶].

تهیه خمیر و پخت نان

با استفاده از آرد سفید گندم و روش پخت استاندارد نان موردنیاز تهیه شد مواد مصرفی شامل: آرد گندم + آب + خمیر مایه + بهبود دهنده + نمک و شکر + سویه پروبیوتیک

سویه پروبیوتیک به‌میزان ۱/۵×۱۰^۸(۰/۵ مک فارلند) به ازای هر گرم آرد اضافه شد.

اثبات پایداری باکتری

برای جست‌وجوی باکتری‌های زنده، ابتدا ۱۰گرم از خمیرترشی که باکتری به آن اضافه شده برداشت کرده و با ۹۰cc آب مقطر مخلوط شده، همین عمل پس از پخت نان نیز تکرار شد؛ سپس از این ترکیبات رقت سریالی تهیه شد و به روش پورپلیت، باکتری‌ها کشت داده و شمارش انجام شد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

آزمونpH پس از پخت نان

برای اندازه‌گیری pH، ۱۰ گرم از خمیر قبل از پخت و ۱۰ گرم مغز نان پخته شده را جداگانه با ۹۰ cc آب مقطر مخلوط کرده روی لرزاننده قرار می‌دهیم تا ترکیب یکنواختی ایجاد شود. pH هرکدام ابتدا با pH سنج تعیین شد، سپس به آرامی به آن NaOH، ۰/۱ نرمال اضافه کرده تا pHآن به ۷ برسد. در این زمان میزان سود اضافه شده برای تعیین TTA (TTA: Total Titritable Acidity)از روی بورت مدرج خوانده شد [۲۳].

آزمون نشاسته و قند

برای این‌کار از معرف ید یا لوگل استفاده می‌شود. در حضور ید، نشاسته موجود در محیط با آن واکنش داده و تولید رنگ آبی می‌کند، که نشان‌دهنده هیدرولیز شدن نشاسته است. در آزمایش‌های مثبت می‌توان از روی شدت رنگ تولیدشده میزان هیدرولیز تقریبی را براورد کرد [۲٤].

برای بررسی میزان قند نمونه از کیت آزمایشگاهی پارس آزمون و دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر از نمونه را با ۱ccاز معرف مخلوط کرده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط و یا ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه کرده و در بیشترین حالت طی ٦۰ دقیقه، جذب نوری نمونه‌ها در برابر بلانک اندازه‌گیری شد [۲۵].

۳- یافته‌ها

تست‌های بیوشیمیایی

با آزمایش‌های انجام‌شده مشخص شد این باکتری باسیل گرم مثبت، اسپوردار، متحرک و کاتالاز مثبت است؛ در حالی‌که ایندول و هیدروزلیز ژلاتین آن منفی است.

تست تخمیری قندها نیز نشان داد که سویه مورد نظر توانایی تخمیر ۵ قند آزمایش شده را داشته و از آن‌جا که این یافته‌ها با مشخصات *باسیلوس کواگولانس* مطابقت داشت، ثابت می‌کند که باکتری مورد نظر همان *باسیلوس کواگولانس* است.

جدول ۱ تست‌های بیوشیمیایی *باسیلوس کواگولانس*

رنگ‌آمیزی گرم	+
حرکت	+
کاتالاز	+
تست ایندول	−
هیدرولیز ژلاتین	−

جدول ۲ تست تخمیر قندها به وسیله‌ی *باسیلوس کواگولانس*

گلوکوز	+
لاکتوز	+
گالاکتوز	+
فروکتوز	+
مانوز	+

مقاومت به نمک:

هر دو سویه آزمایش شده در غلظت تا ۵ درصد به میزان ++ رشد داشته و این مقدار در غلظت ۱۰ درصد به + کاهش یافت؛ ولی در ۲۰ درصد نمک هیچ‌گونه کدورتی در لوله‌ها و رشدی در ظرف مشاهده نشد.

مقاومت به گرما:

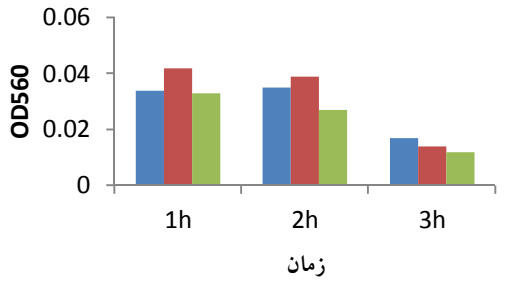
سویه آزمایش شده توانست دمای ۱۰۰ درجه را به‌مدت ۲۰ دقیقه تحمل کند و تعداد باکتری‌های زنده پس از پورپلیت برابر و یا بیشتر از 10^5 تخمین زده شد.

تست تحمل صفرا:

نمودار زیر براساس میزان تحمل باکتری آزمایش شده در مقابل اسیدهای صفراوی گزارش شد، در این آزمون با توجه به طول موج‌های خوانده شده، بیشترین رشد در

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

باسیلوس کواگولانس در غلظت ۰/۲ درصد صفرا پس از یک ساعت قرارگیری در محیط صفراوی مشاهده شد.

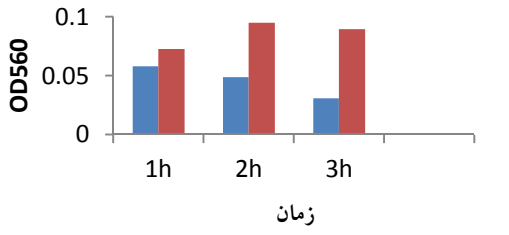


غلظت ۰/۱ ٪ ؛ غلظت ۰/۲ ٪ ؛ غلظت ۰/۳ ٪

نمودار ۱ جذب نوری غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی در واحد زمان در طول موج ۵۶۰ نانومتر

مقاومت به اسید و پپسین:

همانطور که از نمودارهای زیر مشخص است، با توجه به طول موج‌های قرائت شده از اسپکترو فوتومتر، سویه موردنظر توانست در مقابل پپسین و pH2 پس از ۱ و ۲ساعت رشد قابل قبولی داشته باشد، اما از رشد آن در ساعت سوم کاسته شده، در عین حال به وضوح نسبت به pH7 رشد کمتری داشت.



pH 7 ؛ pH 2:

نمودار ۲ مقاومت باکتری نسبت به اسید در واحد زمان بر اساس میزان جذب نوری

تست حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها:

نتایج حاصل از بررسی حساسیت آنتیبیوتیکی بیان گر آن است که هر دو سویه نسبت به آنتی بیوتیک‌های انتخابی حساس بوده اما نسبت به آموکسی سیلین مقاوم بودند. همچنین به‌منظور تعیین میزان دقیق قطر هاله عدم رشد و تطبیق آن با استانداردهای CLSI، از دستگاه آنتی بیوگراف استفاده شد.

(AMX) آموکسی سیلین، (GM)، (TE) تتراسایکلین، (D) داکسی سایکلین، (L) لینکومایسن، (N) نئومایسین

جدول ۳ حساسیت *باسیلوس کواگولانس* نسبت به آنتی بیوتیک‌ها بر اساس قطر هاله عدم رشد(بر حسب mm)

ردیف	حساس	*B. coagolans*
GM	≥۱۵	۲۶
D	≥۱۶	۲۵
N		۱۷
TE	≥۱۶	۱۹
L		۱۷
AMX	≥۱۸	۵

نتیجه اینکه این باکتری نسبت به آموکسیسیلین مقاوم بوده و در مقابل سایر آنتیبیوتیک‌های مورد آزمایش حساسیت نسبی دارد [۲۲].

ممانعت از رشد سویه‌های بیماریزا:

نتایج مربوط به خاصیت ضد میکروبی سویه‌های مورد آزمایش با روش نقطه‌ای و با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد باکتری‌های اندیکاتور (*Staphylococcus aureus* و *Entrococcus fecalis* *Ecoli* ,) مشخص و معلوم شد که خاصیت ضدمیکروبی *باسیلوس کواگولانس* بیشترین تاثیر را بر باکتری *Ecoli* دارد.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

جدول ٤ نتایج روش کشت نقطه‌ای: قطر هاله عدم رشد برحسب mm

اندیکاتور	*B. coagolans*
E. coli	٢٠
ST. aureus	١٧
E. fecalis	١٨

اثبات حضور باکتری در نان پخته شده:

پس از نگهداری باکتری‌ها به‌مدت یک هفته در یخچال و کشت و انجام پورپلیت مشخص شد که بطور میانگین $١٠^{٥}$ سلول در هر گرم از نان زنده باقی مانده‌اند، اما شکل آن‌ها در اثر این ماندگاری تغییر یافته و به حالت رشته‌ای در آمده بود.

جدول ٥ تعداد باکتری در هر گرم از نمونه (CFU/m)

ردیف	تعدادباکتری در خمیرترش	تعدادباکتری در نان	تعدادباکتری پس از یک هفته
١	$١٠^{٨}$×١	$١٠^{٦}$×٥	$١٠^{٥}$×٧
٢	$١٠^{٨}$×١	$١٠^{٦}$×٤	$١٠^{٦}$×٣
٣	$١٠^{٨}$×١	$١٠^{٦}$×٥	$١٠^{٦}$×٥
میانگین	$١٠^{٨}$×١	$١٠^{٦}$×٤/٦	$١٠^{٥}$×٢٩
SD	٠	$١٠^{٦}$×٠/٨٢	$١٠^{٥}$×٢٠/٥

آزمون pH:

در ٤ حالت خمیر مورد بررسی قرار گرفت، نتایج به‌صورت زیر گزارش شد: (میزان سود اضافه شده به ١٠^{cc} محلول) (Total Titritable Acidity=TTA).

جدول ٦ میزان pH در نمونه های مورد آزمایش

ردیف	خمیر ور نیامده	خمیر ور آمده	خمیر+باکتری	نان
pH	٥	٤/٥	٤	٥
TTA	٦	٨	٨	٦

آزمون نشاسته و قند:

آزمایش انجام شده با استفاده از معرف لوگول، شدت رنگ کمتری را در نمونه نان مورد آزمایش نسبت به خمیر نشان داد، که این امر حاکی از آن است که نشاسته در نان پخته شده توسط باکتری‌های موجود در آن هیدرولیز شده است.

شکل ١ بررسی میزان نشاسته در نمونه خمیر و نان داری باکتری

و نتایج به دست آمده برای تست قند بیانگر آن است که باکتری، نشاسته موجود را تجزیه کرده و باعث افزایش میزان قند پس از پخت نان می‌شود: (جذب نوری با استفاده از اسپکتروفوتومتر و در طول موج ٥٢٠ نانومتر قرائت شد).

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

جدول ۷ بررسی کاهش قند بر اساس جذب نوری

ردیف	جذب نوری nm۵۲۰
خمیر	۲۳۳
نان دارای پروبیوتیک	۱۱۶
نان فاقد پروبیوتیک	۱۰۰

ماندگاری نان و بقای باکتری:

برای بررسی بقای باکتری در نان، قسمتی از آن در فریزر (-۱۷درجه)، قسمتی در یخچال (٤درجه) و قسمتی نیز در دمای محیط قرار گرفت، پس از یک هفته نمونه‌ها مجددا مورد سنجش قرار گفتند، از هر قسمت برداشت کرده، رقت تهیه شد وبه روش پورپلیت کشت داده شد، وجود *باسیلوس کواگولانس* در هر ۳نمونه تایید شد. شایان ذکر است که نمونه تهیه شده با پروبیوتیک نسبت به نمونه شاهد فاقد باکتری، در طول این مدت از مرغوبیت و تازگی بیشتری برخوردار بود.

ارزیابی حسی:

نمونه غنی سازی شده به‌همراه یک نمونه شاهد فاقد باکتری، از لحاظ کیفی (ویژگی‌های خارجی و بافت داخلی نان) از جمله حجم، رنگ، عطر و طعم نان توسط کارشناسان غلات مورد ررسی قرار گرفته و مشخص شد که نمونه غنی‌سازی شده از هر لحاظ کیفیت بالاتر و مطلوب‌تری نسبت به نمونه شاهد داشته است.

جدول ۸ نتایج حاصل از آزمون ذائقه سنجی

	نمونه شاهد		نمونه غنی شده	
ویژگی‌ها	جمع امتیاز	میانگین	جمع امتیاز	میانگین
رنگ نان	۹۵	٤/۷۵	۹۷	٤/۸۵
پوکی و تخلخل	۸۸	٤/٤	۹۲/۵	٤/٦۲
بافت نان	۸۸	٤/٤	۹۰/۵	٤/۵۲
قابلیت جویدن	۹۱	٤/۵۵	۹۳/۵	٤/٦۷
بو، طعم، مزه	۸۸	٤/٤	۹۲	٤/٦
امتیاز نهایی	٤۵۰		٤٦۵/۵	

٤- بحث

با توجه به اینکه نان یکی از غذاهای اصلی محسوب می‌شود، استفاده از یک پروبیوتیک خوب و مقاوم به شرایط سخت محیطی در آن، میتواند کمک شایانی به بهبود و پیشرفت سلامت جامعه نماید.

پژوهشگر علوم صنایع غذایی دانشگاه تربیت مدرس (ناصر پوراسماعیل) طی تحقیقی در سال ۸۹ موفق به ارائه فرمولاسیون و همچنین تولید نان پریبیوتیک بدون گلوتن با استفاده از آنزیم ترانس گلوتامیناز و هیدروکلوئیدهای گوآر و زانتان شد [۱۷]. در سال ۲۰۰۷ نیز تحقیقی در سوئد انجام شد، برای استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک در نان‌های حجیم، در این تحقیق از انواعی از لاکتوباسیلوس‌ها استفاده شد، اما از آنجا که این باکتری‌ها فاقد اسپور هستند، قادر به تحمل دمای پخت نبوده و ازبین میروند، لذا در این تحقیق باکتری‌های مورد نظر به‌صورت محلول، به‌طور پاششی و یا تزریقی به مرکز نان پس از پخت و رسیدن دمای نان به ٤۰-٤۵ درجه به ان اضافه شده. [۱۸]

درسال ۲۰۱۰ نیز شرکت Genden Biotec در امریکا موفق به شناسایی و معرفی سویه ای از باسیلوس کواگولانس تحت عنوان Genden BC30(Bacillus coagulans GBI-30, 6086)، شد که در هر نوع ماده غذایی پختنی قابل استفاده میباشد[۲]، ولی از آنجا که این باکتری تحت انحصار موسسه مذکور است دسترسی به آن در شرایط فعلی امکان پذیر نمی‌باشد، لذا در این تحقیق سعی شد آزمایشاتی روی باکتری موجود انجام شده و قابلیت استفاده از آن در مواد پختنی بخصوص نان‌های حجیم مورد بررسی قرار گیرد، پتانسیل‌های کاربردی بیشتری برای پروبیتیک‌ها وجود دارد که نیازمند تحقیقات

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

و بررسی‌های عمیق و بیشتری برای رسیدن به فردایی بهتر در استفاده از این باکتری‌های مفید میباشد. [۳]

۵- مراجع

[1] FAO/WHO. (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.

[2] Gandane Lab: (2008) Ganeden Biotech, Inc.

[3] De Vecchi E and Drago L. (2006). Lactobacillus sporogenes or Bacillus coagolans: misidentification or mislabelling? International Journal of Probiotics and Prebiotics Vol. 1, No. 1, pp. 3-10

[4] Duc. Le H, Huynh A. (2004). Characterization of Bacillus Probiotics Available for Human Use, American Society for Microbiology

[5] Maathuis A. J. H, Keller. D and Farmer. S. (2009). Survival and metabolic activity of the GanedenBC^{30} strain of Bacillus coagulans in a dynamic in vitro model of the stomach and small intestine

[6] Baron. Mira, MD. (2009). A Patented Strain of Bacillus coagulans Increased Immune Response to Viral Challenge.

[7] Douglas. S, Kalman,et al. (2009). A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled parallel-group dual site trial to evaluate the effects of a Bacilluscoagulans-based product on functional intestinal gas symptoms. BMC Gastroenterology

[۸] ملک زاده، ف. ۱۳۸۵- بیوتکنولوژی میکروبی (جلد دوم). انتشارات دانشگاه تهران. ۴۹۰

[9] Providence food company: Makers of Synflora™ Functional Food Products

[10] Dolin BJ. (2009). Effects of a proprietary Bacillus coagolans preparation symptoms of diarrhea a predominant irritable bowel syndrome

[11] Laird Joyce. (2010). New advances in baking with probiotics

[12] Ratna Sudha,M. (2010). Molecular Typing and Probiotic Attributes of a New Strain of Bacillus coagulans –Unique IS-2: a Potential Biotherapeutic Agent. Genetic Engineering and Biotechnology Journal

[13] Sabinsa Corporation. (2010): www. lactospore. com/back2. htm.

[14] Sreekumar. G and Krishnan Soundarajan. (2010). Isolation and characterization of probiotic Bacillus subtilis SK09 from dairy effluent. Indian Journal of Science and Technology (Vol. 3 No. 8)

[15] Mande David. R ' Eichas Katy. (2010). Bacillus coagulans: a viable adjunct therapy for relieving symptoms of rheumatoid arthritis according to a randomized

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]

[16] Yuan Kun Lee (2009). Hand Book of Probiotics & prebiotics. 2nd Edition. Published by John Wiley & Sons, Inc. , Hoboken, New Jersey

[۱۷] پوراسماعیل، ن. ۱۳۸۹. فورمولاسیون وساخت نان فاقد گلوتن با استفاده از آنزیم‌های ترنس آمیناز و هیدروکلوئیداز گوار وزانتان. پایان نامهکارشناس ارشد. رشته صنایع غذایی دانشگاه تربیت مدرس

[18] WO. (2007) Probiotic Bread & method of its production

[19] Hoque. M. Z. (2010). Identification and Analysis of Probiotic Propertiesof *Lactobacillus Spp.* From Selective Regional Yoghurts. World Journal of Dairy & Food Sciences, Corresponding Author:, Biotechnology and Genetic Engineering Discipline, Khulna University,Isolation,

[20] Lactobacillus Sporongenes. Bacillus coagulans A superior Probiotic. mht

[21] Palop,A. (1997). Occurrence of a Highly Heat-Sensitive Spore Subpopulation of Bacillus coagulans STCC 4522 and Its Conversion to a More Heat-Stable Form. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, , p. 2246–2251

[22] Franklin,R. (2009). Summary Minutes Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI(Clinical & Laboratory Standards Institute)

[23] Darrell Greenwood, (2004). How does one measure the ph of sourdough, web4 (at) telus. net

[۲٤] اشرفی، ف. (۱۳۸۵) میکروبیولوژی عملی. احسن. تهران. ۲۷۰

[25] Thomas, L. (1998). Clinicall aboratory diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesllschaft. 131-7

[۲٦] دمشقیان، م. ۱۳۸۸. بررسی تاثیر باکتری‌های اسید لاکتیک در کاهش کلسترول و توان کلونیزاسیون باکتری‌های انتروتوکسیژنیک. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-05-18]